

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2744688号

(45) 発行日 平成10年(1998) 4月28日

(24) 登録日 平成10年(1998) 2月6日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	P I
C 0 7 B 57/00	3 1 0	C 0 7 B 57/00 3 1 0
B 0 1 J 20/26		B 0 1 J 20/26 L
G 0 1 N 30/48		G 0 1 N 30/48 W
// C 0 7 C 51/47		C 0 7 C 51/47
59/84		59/84

請求項の数1(全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平2-267790	(73) 特許権者	999999999 昭和電工株式会社 東京都港区芝大門1丁目13番9号
(22) 出願日	平成2年(1990)10月5日	(72) 発明者	鈴木 廣志 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電 工株式会社総合技術研究所内
(65) 公開番号	特開平4-145032	(72) 発明者	渡辺 浩子 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電 工株式会社総合技術研究所内
(43) 公開日	平成4年(1992)5月19日	(72) 発明者	森口 征矢生 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電 工株式会社総合技術研究所内
審査請求日	平成8年(1996)3月18日	(74) 代理人	弁理士 矢口 平
		審査官	西川 和子

(54) 【発明の名称】 液体クロマトグラフィー用充填剤

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 バンコマイシン群抗生物質またはその誘導体が、共有結合を介して溶媒に不溶性の担体に固定化されてなることを特徴とする液体クロマトグラフィー用充填剤。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は新規な液体クロマトグラフィー用充填剤に関する。

【従来の技術】

近年光学活性な物質に対する関心が著しく高まっている。これは生体成分であるアミノ酸、糖類、タンパク質および核酸などがいずれも不斉中心を持つ光学活性化合物であり、生命現象のあらゆる場面に、これらの光学活性化合物が重要な働きをしていることが強く認識される

2

ようになったためである。また、光学活性化合物の持つ性質を利用して、最近では強誘電性液晶などの開発も盛んに行われている。そして、化学的に合成してこれらの光学活性化合物を得る場合、目的とする光学活性化合物に対する光学異性体が同時に得られるのが通常であるが、これらを分離分析する手段として液体クロマトグラフィーを用いる方法が普及してきた。

液体クロマトグラフィーで光学異性体を分離、分析する方法としては、以下の3つの方法が知られている。即ち、第一の方法は光学活性な試薬を用いて目的とする化合物を誘導体化し、ジアステレオマーとして通常の分配吸着カラムなどで分離する方法、第二の方法は液体クロマトグラフィーの移動相に光学活性な試薬を添加し、目的とする化合物との間で錯体を形成させて分離する方法、そして第三の方法は固定相を光学活性な試薬で修飾

10

(2)

特許2744688

3

し、目的とする化合物と固定相との相互作用を利用して分離する方法である。

更に、第三の方法に用いる光学活性な固定相を大別すると、

①フェニルグリシンやバリン、ナフチルエチルウレア等の低分子化合物やその誘導体で修飾したもの。

②シクロデキストリンやクラウンエーテル等の包接能を有する化合物で修飾したもの。

③牛血清アルブミン、オボムコイド、 α 1-酸性糖タンパク質等のタンパク質で修飾したもの。

④ブロリン、ヒドロキシブロリン等のアミノ酸の銅錯体で修飾したもの。

等があげられる。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしながら、これら上述の方法にはいずれも次のような問題がある。第一の目的とする化合物を誘導体化する方法は時間がかかり、しかも使用する光学活性試薬のラセミ化や、反応に副生成物が生ずる可能性もあり、光学的純度の測定には必ずしも最適な方法とは言えない。また、第二の添加剤を加える方法は試料を分取する目的には適さず、また経済性にも問題がある。第三の光学活性な固定相を利用する分離法は、前記の第一、第二の方法の持つ欠点を克服していると言えるが、①の低分子化合物を用いた固定相は、ヘキサンを主体とした溶媒でのみ光学識別能を発揮する場合が多く、また分割される化合物の範囲も限られるという欠点を有している。②の包接能を有する化合物を用いた固定相も、対象となる化合物の立体的な大きさについての制約が大きく、且つ用いられる溶媒の種類が水、アルコール系や過塩素酸水溶液に限られており、更に、低温で分析を行わなければ満足いく分割が得られない等の欠点を有している。③のタンパク質を用いた固定相は比較的広い範囲の化合物を分割し得るが、タンパク質を用いているため、有機溶媒の使用が困難なことと固定相の劣化が比較的に多いこと、ごく少量の試量でのみしか分割が行われない等の欠点を有している。そして④の銅錯体を用いた固定相は溶媒に銅塩を添加しなければならないことと、分割し得る化合物がアミノ酸誘導体などに限られるなどの欠点を有している。

本発明の目的は上記のような従来技術に伴う問題点を解決した充填剤、即ち、目的とする化合物に対し広い適用範囲を持ち、かつ測定条件に制約の少ない、極めて安定な液体クロマトグラフィー用充填剤を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者等はバンコマイシンの持つ特定のペプチド鎖を認識する性質に着目し、バンコマイシンを固定化した液体クロマトグラフィー用充填剤の研究を鋭意重ねた結果、この充填剤が上記目的を達成し得るものであることを見い出した。

4

さらにバンコマイシンと類似した構造と作用機作を有する抗生物質群またはその誘導体で、これらを固定化した充填剤もバンコマイシンと同様に、光学認識能を待つことが確かめられた。

即ち、本発明の要旨は、バンコマイシン群抗生物質またはその誘導体が、共有結合を介して溶媒に不溶性の担体に固定化されてなることを特徴とする液体クロマトグラフィー用充填剤にある。以下本発明の液体クロマトグラフィー用充填剤を本発明の充填剤と称する。

バンコマイシンは、ストレプトマイセスオリエンタリスによって産出される抗生物質で、ブドウ球菌、連鎖球菌などのグラム陽性菌に有効である。その作用機作としては、ペプチドグリカン前駆体のD-アラニール-D-アラニン基と特異的に結合し、細菌細胞壁のペプチドグリカンの生合成を阻害することが知られている。

バンコマイシン群抗生物質とは、例えば、バンコマイシン、リストセチン、アクチノイシン、アポバルシン、アクタブラニン、テイコマイシンなどを例示することができる。また、それらの誘導体とは、その水酸基またはアミノ基をアシル化、アルキル化、アラルキル化した化合物、またはカルボキシル基をエステル化した化合物などを例示することができる。

本発明の充填剤に用いられる溶媒としては水の他に例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、エチレン等のアルコール類、THF、ジオキサン、エチルエーテル、イソプロピルエーテル等のエーテル類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、シクロヘキサン等の炭化水素類、クロロホルム、エチレンクロライド、シクロロエタンなどのハロゲン化炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等のアミド類、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル等が用いられ、これらは単一でも混合溶媒系でもよい。また、これらの塩の添加物を用いることもできる。このように、従来の充填剤と比べて溶媒に制約が少ないことが本発明の充填剤の特徴の一つである。

次に、本発明に用いられる担体については、上述のような通常液体クロマトグラフィーに用いられる溶媒に不溶なものであれば特に制限はない。例えばセルロースやアガロースなどの天然高分子系の担体、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミドなどの合成高分子系の担体、シリカ、アルミナ、ジルコニアなどの無機系の担体などを例示することができる。

バンコマイシン群抗生物質またはその誘導体を、溶媒に不溶性の担体に固定化する方法については特に制限はない。即ち、バンコマイシン群抗生物質またはその誘導体に存在する水酸基、アミノ基、カルボキシル基などの反応性の官能基と、担体に存在する反応性の官能基、ま

(3)

特許2744688

5

たは担体に結合基（以下スペーサーと称する。）を導入し、そのスペーサーに存在する官能基と結合させて行うことができる。担体を導入するスペーサーについても特に制限はなく、両末端に反応性の官能基を有していればよい。バンコマイシン群抗生物質またはその誘導体に存在する水酸基と結合が可能な官能基としては、エポキシ基、カルボキシル基、スルホン酸基、ハロゲン基などがあげられ、これらの官能基が担体またはスペーサーに存在すればよい。バンコマイシン群抗生物質またはその誘導体に存在するアミノ基と結合が可能な官能基としては、エポキシ基、カルボキシル基、スルホン酸基、ハロゲン基、アルデヒド基、などがあげられ、これらの官能基が担体またはスペーサーに存在すればよい。バンコマイシン群抗生物質またはその誘導体に存在する官能基が、カルボキシル基である場合は、それらと結合が可能な官能基としては、アミノ基、エポキシ基、水酸基、ヒドラジノ基、チオール基などがあげられ、これらが担体またはスペーサーに存在すればよい。

担体または担体に結合したスペーサーに、バンコマイシン群抗生物質またはその誘導体を共有結合させるに際しては、担体またはスペーサーが有する官能基に応じて必要であれば、適宜触媒や反応試薬などを用いて適当な溶媒下で行うことが出来る。触媒としては、例えば塩酸や炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウムなどの酸、アルカリが主として官能基がエポキシ基の場合に用いられる。また、反応試薬としては、例えばN-ヒドロキシコハク酸イミドとジシクロヘキシルカルボキシイミドの組合せが官能基がカルボキシル基の場合に、また、ジシクロヘキシルカルボキシイミドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドのような縮合剤が官能基がカルボキシル基、アミノ基、またはヒドラジノ基の場合に、また、1,1'-カルボニルジイミダゾールや2-フルオロ-1-メチルピリジニウム、p-トルエンスルホネートのような縮合剤が官能基がカルボキシル基、アミノ基、ヒドラジノ基または水酸基の場合に用いられ、また水素化シアノホウ素ナトリウムのような還元剤が官能基がホルミル基の場合に用いられるなどなどを例示することが出来る。また、溶媒としては水や、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドのようなバンコマイシン群抗生物質またはその誘導体を溶解することが可能な溶媒を用いればよい。更に水はリン酸や酢酸緩衝液として用いることもでき、また塩化ナトリウムや硫酸ナトリウムなどの無機塩類を添加して用いることも可能である。

バンコマイシン群抗生物質またはその誘導体と担体または担体に結合したスペーサーとの反応条件については必ずしも制限はないが、一般に次のような範囲で行うことが適当である。

担体またはスペーサーを結合させた担体とバンコマイシン群抗生物質またはその誘導体の重量比は1:0.01~2、

6

00. 好ましくは1:0.05~0.2;反応温度は0℃~80℃、好ましくは4℃~40℃;反応時間は1~72時間、好ましくは2~12時間である。反応後の後処理についても特別な要件はなく、ろ別洗浄等通常行われている方法にて適宜実施される。

このようにして得られた本発明の充填剤は、タンパク質で固定相を修飾した充填剤では変性の可能性がある60℃~80℃という高温で使用することも可能である。

【実施例】

次に下記のような方法で製造した本発明の充填剤およびそれを用いた分析例について代表的な例を示し、更に具体的に説明する。但しこれらは本発明の充填剤の一例であって本発明はこれらになんら制限されないことは言うまでもない。

実施例1

グリシジルメタクリレートとエチレングリコールジメタクリレートから得られたエポキシ基含有ゲル状共重合体のエポキシ基を水で開環変性し、更にエピクロルヒドリンでエポキシ基を導入したゲル（エポキシ基：乾燥ゲル1gあたり0.3ミリモル）1.0gをバンコマイシン0.1gを含む0.1モル水酸化ナトリウム水溶液10mlに加えて摂氏40度で24時間攪はん後、摂氏4度で一夜放置した。ゲルをろ取り1%酢酸水溶液および水で洗浄した。こうして得られた液体クロマトグラフィー用充填剤は、乾燥ゲル1gあたりバンコマイシンを15mg担持させていることが未反応原料を高速液体クロマトグラフィーで分析することにより確かめられた。

実施例2

多孔性シリカゲル（和光純薬（株）製：ワコーゲルLC-10K）に3-グリンドキシプロピトリメエトキシシランでエポキシ基を導入したゲル（エポキシ基：乾燥ゲル1gあたり0.3ミリモル）1.0gをバンコマイシン0.1gを含む0.1モル水酸化ナトリウム水溶液10mlに加えて摂氏40度で24時間攪はん後、摂氏4度で一夜放置した。ゲルをろ取り1%酢酸水溶液及び水で洗浄した。こうして得られた液体クロマトグラフィー用充填剤は、乾燥ゲル1gあたりバンコマイシンを15mg担持させていることが未反応原料を高速液体クロマトグラフィーで分析することにより確かめられた。

実施例3

グリシジルメタクリレートとエチレングリコールジメタクリレートから得られたエポキシ基含有ゲル状共重合体のエポキシ基を水で開環変性し、更に1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテルでエポキシ基を導入し、次いでアンモニアと作用させて得た（アミノ基：乾燥ゲル1gあたり0.2ミリモル）ゲル1.0gをバンコマイシン0.2gを含む0.1モルリン酸水素ナトリウム緩衝液（pH 6.5）5mlに加え、次いで1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド約20mgを加えて氷冷して攪とう下で3時間反応させた。次いでゲルをろ取り、1M

(4)

特許2744688

7

塩化ナトリウム水溶液および水で洗浄した。こうして得られた液体クロマトグラフィー用充填剤は乾燥ゲル1gあたりバンコマイシンを約20mg担持させていることが未反応原料を高速度液体クロマトグラフィーで分析することにより確かめられた。

実施例4

グリシジルメタクリレートとエチレングリコールジメタクリレートから得られたエポキシ基含有ゲル状共重合体のエポキシ基を水で開環変性し、更に1、4-ブタンジオールジグリシジルエーテルでエポキシ基を導入し、

次いで水により該エポキシ基を開環変性させたゲルに1、1'-カルボニルジイミダゾールを作用させて水酸基を活性カルボニル基で活性化させたゲル2.0gにバンコマイシン0.1gを含む0.1モル炭酸水素ナトリウム水溶液10mlに加えて摂氏40度で4時間攪はん後、摂氏4度で一晩放置した。ゲルをろ取り1Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.5) 10mlに2時間懸濁させ、その後1M塩化ナトリウム水溶液および水で洗浄した。こうして得られた液体クロマトグラフィー用充填剤は、乾燥ゲル1gあたりバンコマイシンを15mg担持させていることが未反応原料を高速度液体クロマトグラフィーで分析することにより確かめられた。

実施例5

多孔性セルロースゲル(チュッ(株)製:セルロファインA-3)に20%水酸化ナトリウム存在下エピクロロヒドリンでエポキシ基を導入し、次いで過ヨウ素酸ナトリウムを作用させてアルデヒド基を導入した(アルデヒド基:ゲル1mlあたり0.05ミリモル)ゲル2.0gをリストセチン0.1gを含む0.1モルリン酸水素ナトリウム緩衝液(pH 8.0) 10mlに加え、更に水素化シアノホウ素ナトリウム20mgを加えて摂氏30度で12時間攪はんした。ゲルをろ取り1M塩化ナトリウム水溶液および水で洗浄した。こうして得られた液体クロマトグラフィー用充填剤はゲル1mlあたりリストセチンを4mg担持させていることが未反応原料を高速度液体クロマトグラフィーで分析することにより確かめられた。

実施例6

グリシジルメタクリレートとエチレングリコールジメタクリレートから得られたエポキシ基含有ゲル状共重合体を水により該エポキシ基を開環変性し、更に1、4-ブタンジオールジグリシジルエーテルでエポキシ基を導入し、次いでアンモニアと作用させて得た(アミノ基:乾燥ゲル1gあたり0.2ミリモル)ゲル1.0gをバンコマイシン0.2gの無水酢酸によるアセチル化物(水酸基またはアミノ基のアセチル化度は約40%;NMRスペクトルより推算した。)を含む0.2Mリン酸水素二カリウム水溶液5mlに加え、次いで1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド約20mgを加えて氷冷して振とう下で3時間反応させた。次いでゲルをろ取り、1M塩化ナトリウム水溶液および水で洗浄した。こうして得られた

8

液体クロマトグラフィー用充填剤は乾燥ゲル1gあたりアセチル化バンコマイシンを約20mg担持させていることが未反応原料を高速度液体クロマトグラフィーで分析することにより確かめられた。

応用例1

実施例1~6で得られた液体クロマトグラフィー用充填剤を内径8mm長さ50mmのステンレス製カラムにスラリー法で充填し、得られたカラムを用いてアミノ酸誘導体の1例としてCBZ-アラニンを、また医薬品の1例としてケトプロフェンを分離した。測定条件は次の通りである。

溶解液:0.1M 燐酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)

溶解速度:1.0ml/min

検出器:紫外分光光度計 254nm

この結果を表1、表2に示す。

表 1

充填剤の種類	保持時間(分)		分離係数 α
	CBZ-アラニン		
	Dフォーム	Lフォーム	
実施例1	7.2	5.0	1.73
実施例2	5.8	5.4	1.11
実施例3	4.9	4.4	1.2
実施例4	5.4	3.2	2.83
実施例5	13.0	6.4	2.5
実施例6	8.0	7.4	1.11

CBZ:ベンジルオキシカルボニル

表 2

充填剤の種類	保持時間(分)		分離係数
	ケトプロフェン		
	Rフォーム	Sフォーム	α
実施例 1	11.0	14.0	1.35
実施例 2	7.8	9.0	1.22
実施例 3	8.5	10.5	1.33
実施例 4	9.0	12.6	1.55
実施例 5	10.8	17.3	1.78
実施例 6	14.0	15.5	1.13

【発明の効果】

本発明によって提供されるバンコマイシン誘導体またはその誘導体が共有結合を介して溶媒に不溶性の担体に固定化されてなる液体クロマトグラフィー用充填剤は、変性、劣化の可能性が少なく、極めて安定で、また、溶媒の制約も従来の充填剤と比べて少ない。さら

(5)

特許2744688

9

10

に、分離の対象とする化合物に関しても、本充填剤を用いることにより、アミノ酸、アミノ酸誘導体、オキシ酸*
 *誘導体、医薬品などの種々の光学異性体を高速液体クロマトグラフィーにより分離分析することが可能である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[°]

識別記号

F I

C 0 7 K 17/08

C 0 7 K 17/08

17/10

17/10